

Характер изменений веществ низкой и средней молекулярной массы при острых экспериментальных отравлениях верапамилом

¹Б.Б. Яцинюк, к.м.н., доцент, ¹Л.Г. Никонова, к.б.н., доцент,
²К.М. Брусин, д.м.н., профессор

The nature of the changes of low and medium molecular weight substances in acute experimental verapamil poisoning

B.B. Yatcinuk, L.G. Niconova, K.M. Brusin

Резюме

Исследованиями установлено влияние верапамила на получение и интерпретацию значений экстинкций в плазме и на эритроцитах, спектра веществ низкой и средней молекулярной массы, при оценке водного раствора супернатанта в диапазоне длин волн от 246 до 298 нм.

Ключевые слова: отравление, верапамил, вещества низкой и средней молекулярной массы.

Summary

Results of the investigation have revealed the influence of verapamil on getting and interpretation meanings of extinctions in plasma and in erythrocytes. Substances' spectrum with low and medium molecular mass was estimated in aqueous solution of supernatant in range of wavelength from 246 to 298 nm.

Key Words: poisoning, verapamil, substances of low and medium molecular weight.

Введение

Установлено, что при химических, инфекционных и других воздействиях в организме образуются вещества низкой и средней молекулярной массы [4,7], часть из которых обладает высокой биологической активностью и при соответствующих условиях может выступать в роли токсических активных факторов и вызывать повреждение биологических мембран [6].

Постоянным симптомом острых отравлений является эндотоксикоз, развивающийся вследствие накопления в организме эндогенных токсических веществ в результате повреждения органов и систем [5,7]. Тяжесть эндогенной интоксикации, как правило, зависит от дозы поступившего экзогенного вещества и возникает в ранний период после отравления (стадия накопления факторов эндотоксемии).

Одним из патогенетических факторов нарушения сердечной деятельности при острых от-

равлениях может быть эндотоксемия, которая обусловлена увеличением содержания веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНСММ) в сыворотке крови и на эритроцитах. Вещества низкой и средней молекулярной массы обладают выраженной биологической активностью [1]; угнетают окислительное фосфорелирование [13], повышают проницаемость стенки кишечника. При нарастании эндотоксемии развивается синдром малого сердечного выброса [3]. Однако сведений об уровне ВНСММ в зависимости от дозы вводимого верапамила и сочетанного действия ВНСММ на сердечно-сосудистую систему в литературе недостаточно [6,7]. Также мы не нашли данных о изменении спектра ВНСММ при наличии верапамила в плазме крови и на эритроцитах. Исследования ВНСММ и их интерпретация позволяет наглядно показать метаболический статус в критическом состоянии при остром отравлении [9].

Целью исследования явилось изучения динамики изменения содержания веществ низкой и средней молекулярной массы в зависимости от дозы введенного верапамила.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 гр. Опыты проводились с учетом положений о соблюдении принципов гуманного обращения с экспериментальными животными [2].

¹Яцинюк Борис Борисович, зав. курсом реанимации, интенсивной терапии и экстремальной медицины Ханты-Мансийского государственного медицинского института, к.м.н., доцент.

¹Никонова Любовь Геннадьевна, к.б.н., доцент кафедры биологии Ханты-Мансийского государственного медицинского института

²Константин Михайлович Брусин, д.м.н., профессор, заведующий областным центром по лечению острых отравлений.

С целью меньшей травматизации животных, точностью дозирования и простоты введения препаратов выбрана внутривенная методика. Верапамил (изоптин) вводился в дозах 1,25 (I группа) и 2,5 мг/100 г массы животного (II группа). Учитывая литературные данные [10] по воздействию экзогенных веществ, угнетающих метаболизм, продолжительность эксперимента составила 60 минут. Также длительность экспериментального отравления была выбрана с учетом способности верапамила в эти сроки вызывать значимые нарушения кардиогемодинамики при острых отравлениях. Контрольную группу составили животные с 60 мин калипсоловым наркозом.

Содержание ВНСММ определяли отдельно в плазме и эритроцитах по методике М.Я. Малаховой [8] на спектрофотометре (СФ-56) Ломо-Спектр. Для этого крупномолекулярные белки плазмы крови и эритроциты осаждали 15% раствором трихлоруксусной кислоты и регистрировали спектральную характеристику водного раствора супернатанта в диапазоне длин волн от 238 до 298 нм. Расчет содержания ВНСММ производили путем интегрального измерения площади фигуры, образованной осью абсцисс, и полученными значениями экстинкций для каждого типа определения плазмы и эритроцитов. Количество ВНСММ определяли по формулам:

$$\text{ВНСММ пл.} = (E_{238} + E_{242} + E_{246} + \dots + E_{298}) \times 4 \text{ усл. ед.}$$

$$\text{ВНСММ эр.} = (E_{238} + E_{242} + E_{246} + \dots + E_{298}) \times 4 \text{ усл. ед.}$$

При трактовке результатов суммарного количества ВНСММ в плазме, учитывая присутствие в крови животных препарата, мы прове-

ли исследования по методике М.Я. Малаховой [8] в нашей модификации со спектром поглощения для верапамила (изоптин) 246-266 и 286-298 нм. Количество ВНСММ в присутствии верапамила (изоптин) определяли по формулам:

$$\text{ВНСММ пл.} = (E_{246} + \dots + E_{266}; E_{286} + \dots + E_{298}); \times 4 \text{ усл. ед.}$$

$$\text{ВНСММ эр.} = (E_{254} + \dots + E_{298}) \times 4 \text{ усл. ед.}$$

На основании значений экстинкций строили спектрограммы.

Результаты и их обсуждение

У контрольных животных содержание ВНСММ в плазме крови и на эритроцитах соответствовали литературным данным [8], и, следовательно, калипсоловый наркоз достоверно не оказывал влияния на уровень ВНСММ (табл. 1). Неспецифические нарушения, возникающие при острых отравлениях и проявляющиеся эндотоксикозом, возникают уже в первые часы отравления [5], поэтому регистрация ВНСММ после часового острого отравления верапамилем в эксперименте представляется значимой.

Регистрируя спектр ВНСММ в диапазоне длин волн (246-298 нм), в плазме крови крыс с острым отравлением верапамилем, обнаружилась повышение экстинкции ВНСММ в плазме на длинах волн с 270 до 282 нм (рис. 1).

При обследовании супернатанта после осаждения эритроцитарной массы резкое снижение на длине волны 250 нм (рис. 2).

Учитывая наличие верапамила (изоптин) в крови у животных с острым отравлением и получение повышенный экстинкций при исследовании плазмы крови на длинах волн с 270 до 282 нм, нами были проведены биохимические иссле-

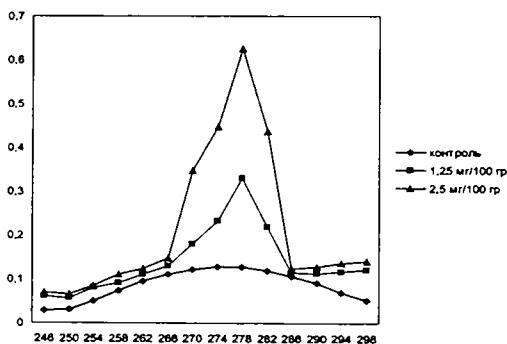


Рис. 1. Изменения содержания ВНСММ в плазме крыс при остром отравлении верапамилем (доза верапамила 1,25, 2,5 мг/100 г массы животного).

По оси абсцисс – длина волны на которой осуществлялась фотометрия (4 нм).

По оси ординат – значения экстинкций (1 условная единица).

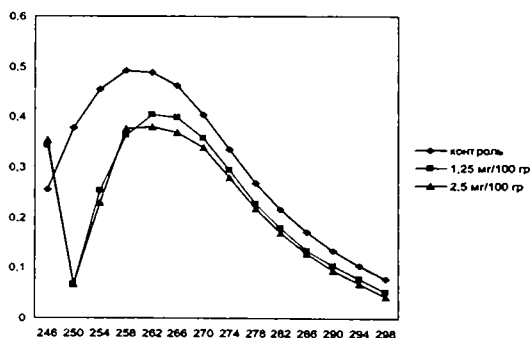


Рис. 2. Изменения содержания ВНСММ в эритроцитах крыс при остром отравлении верапамилем (доза верапамила 1,25, 2,5 мг/100 г массы животного).

По оси абсцисс – длина волны на которой осуществлялась фотометрия (4 нм).

По оси ординат – значения экстинкций (1 условная единица).

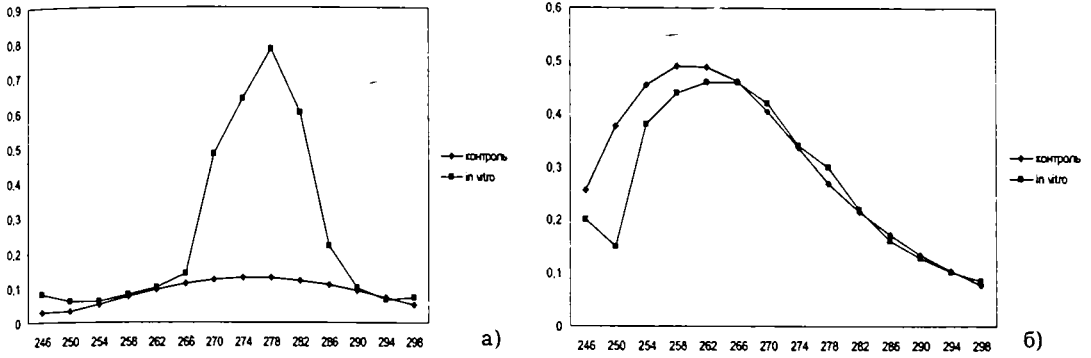


Рис. 3. Содержание ВНСММ в плазме (а) и эритроцитах (б) артериальной крови крыс *in vitro* при добавлении верапамила. По оси абсцисс – длина волны, на которой осуществлялась фотометрия (4 нм). По оси ординат – значения экстинкций (1 условная единица).

дования *in vitro* в плазме и параллельно на эритроцитах. Анализ плазмы крови *in vitro* проводили с дозой верапамила 2,5 мг/100 г массы животного. Для этого к среднему объему крови животного [2,11] массой 180-200 гр. добавляли 1/2 дозы верапамила, введенного внутривенно и инкубировали в течение одного часа. При проведении биохимического исследования плазмы были также установлены высокие экстинкции на длинах волн 270-282 нм (рис. 3а). В эритроцитах *in vitro* полученные результаты практически не отличались от контрольной группы (рис. 3б).

Учитывая химические взаимодействия различных веществ, мы дополнительно провели оценку взаимодействия верапамила и 15% раствора трихлоруксусной кислоты, учитывая

основные положения методики М.Я. Малаховой [12]. Наблюдалось повышение экстинкции на длинах волн от 270 до 282 нм с максимальной экстинкцией при длине волны 278 нм (рис. 4), что соответствует фармакопейной статье [12].

С учетом фармакопейной статьи [12] для подтверждения и правильной трактовки результатов уровня ВНСММ при отравлении верапамилем в эксперименте нами проведено спектрофотометрирование верапамила (рис. 5). Полученные результаты выявили повышение экстинкций на длинах волн 270-282 нм с максимальной экстинкцией при длине волны 278 нм, что объясняет повышение полученных значений в плазме крови крыс при отравлении верапамилем.

Полученные результаты высоких экстинк-

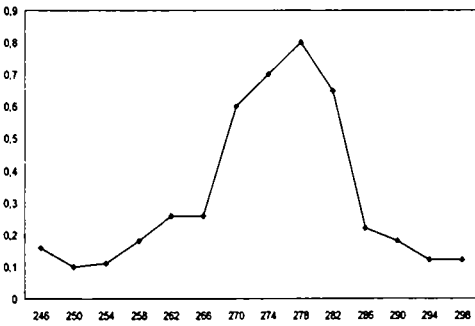


Рис. 4. Экстинкции стандартного раствора верапамила и 15% раствора ТХУ. По оси абсцисс – длина волны на которой осуществлялась фотометрия (4 нм). По оси ординат – значения экстинкций (1 условная единица).

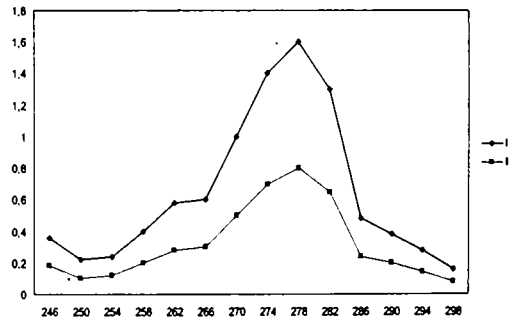


Рис. 5. Экстинкции верапамила в концентрации 2,5 мг/мл (I), 1,25 мг/мл (II). По оси абсцисс – длина волны на которой осуществлялась фотометрия (4 нм). По оси ординат – значения экстинкций (1 условная единица).

Таблица 1. Содержание ВНСММ (ус. ед.) в плазме и эритроцитах крови сонной артерии при остром отравлении верапамилом (M±m)

Группы животных	Плазма		Эритроциты	
	ВНСММ, ус. ед.	% прироста к контрольному уровню	ВНСММ, ус. ед.	% прироста к контрольному уровню
К (n=10)	2,8±0,2	-	17,3±0,7	-
60-я мин острого отравления				
I (n=10)	4,0±0,1*	+ 30	13,0±0,4*	- 24,8
II (n=10)	4,5±0,1*	+37,7	12,3±0,5*	- 30

Примечание. Группы животных. К – контрольная, I – доза верапамила 1,25 мг/100 г, II – 2,5 мг/100 г, * - достоверность различий по сравнению с контролем (p<0,05).

ций в спектре 270-286 нм (верапамил) в плазме крыс с острым отравлением, анализ плазмы *in vitro*, анализ верапамила с 15% раствором ТХУ свидетельствуют о том, что повышение экстинжий в этих пределах обусловлены введенным препаратом.

К концу наблюдения при остром отравлении верапамиллом было выявлено достоверное изменение содержания ВНСММ как в плазме, так и на эритроцитах (табл. 1, рис. 1, 2).

Анализ спектрограмм (рис. 1), полученных на основании исследования плазмы крови, показал, что увеличение экстинжий обусловлено теми же веществами, что и в контрольной группе. На 60-й мин острого отравления в I и II группах прослеживалось достоверное повышение экстинжий с 246 до 266 и 286-298 нм. В I и II группах суммарное значение ВНСММ превышало контроль более чем на 30%.

На эритроцитах через 60 мин острого отравления во всех группах отмечалось достовер-

ное снижение содержания ВНСММ по сравнению с контрольным уровнем (табл. 1, рис. 2). При анализе спектрограмм (рис. 1, 2) было выявлено увеличение содержания ВНСММ в плазме и снижение в эритроцитах, что свидетельствовало о качественном изменении состава ВНСММ.

Выводы

1. Таким образом, в течение 60 мин острого отравления верапамиллом в крови происходит не только накопление ВНСММ в плазме, но и перераспределение их между плазмой и эритроцитами. Можно предположить, что снижение содержания ВНСММ на эритроцитах через 60 мин острого отравления связано с переходом основной массы токсичных продуктов с мембраны эритроцитов в плазму.

2. Интерпретация полученных результатов ВНСММ в плазме и на эритроцитах должна учитывать присутствие медикаментов в крови.

Литература:

1. Белоловова Р.А. Эндотоксикоз как возможный механизм иммунопатологических реакций при травме. Патология органов и систем. Типовые патологические процессы: Тр. I Российского конгресса по патофизиологии; 1996 октябрь 17-19; – Москва, 1996. с. 293.
2. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М: МВД; 2008.
3. Долгих В.Т. Повреждение и защита сердца при острой смертельной кровопотере. Омск; 2002.
4. Зуев В.В. Эндотоксикоз при острых отравлениях карбофосом и способы его коррекции [диссертация]. СПб; 1997.
5. Лужников Е.А., Гольдфарб Ю.С., Мусселиус С.Г. Детоксикационная терапия. СПб; 2000.
6. Лужников Е.А., Гольдфарб Ю.С., Марупов А.М. Особенности диагностики и лечения синдрома эндотоксикоза при острых отравлениях химической этиологии. Анест. и реаниматол. 2002; 2: 9-14.
7. Лужников Е.А., Гольдфарб Ю.С., Марупов А.М. Эндотоксикоз при острых экзогенных отравлениях. М: БИНОМ; 2008.
8. Малахова М.Я. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации. Эфферентная терапия. 1995; 1 (1): 61-4.
9. Соколовская Н.Е., Утешева М.А., Бондарь Е.И. Применение спектрального анализа ВНСММ плазмы и эритроцитов у пациентов отделений реанимации Клинической лабораторной диагностики. 2000; 11: 3-4.
10. Сперелакис Н. Физиология и патофизиология сердца. М: Медицина; 1990.
11. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О., Онищенко Ф.А. Проблема нормы в токсикологии. М: Москва; 1991.
12. Фонд фармацевтической информации. Фармакопейный комитет. с 42-1715-97. Изоптин (инъекционный раствор) определение количественного содержания. 2004.
13. Rinaudo J.B., Gallice P., Crevat A. Action of middle molecules from chronic renal insufficiency treated by hemodialysis on mitochondrial respiration. Biomedicine 1979; 30 (Pt 4): 215-8.